

**PATENT**

Atty. Docket No. 032301WD216

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:	)	
	)	
Dr. Brigitte BATHE, et al.	)	Group Art Unit: To Be Assigned
	)	
Appln. No.: To Be Assigned	)	Examiner: To Be Assigned
	)	
Filed: August 31, 2001 (Herewith)	)	
	)	
For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE sigM GENE	)	

j1046 U.S. PTO  
09/942935  
08/31/01

**CLAIM FOR PRIORITY**

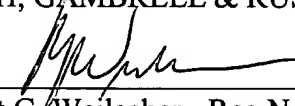
Asst. Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., Applicants hereby claim the benefit of German Application No. 100 43 337.5 filed in Germany on September 2, 2000 relating to the above-identified United States patent application.

In support of Applicants' claim for priority, a certified copy of said German application is attached hereto.

Respectfully submitted,  
SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By   
Robert G. Weilacher - Reg.No. 20531  
1850 M Street, N.W.  
Washington, D.C. 20036  
Telephone: 202/659-2811  
Facsimile: 202/263-4329

August 31, 2001



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 100 43 337.5  
**Anmeldetag:** 02. September 2000  
**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE  
**Erstanmelder:** Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE  
**Bezeichnung:** Neue für das sigM-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen  
**IPC:** C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Juni 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident

Im Auftrag

Faust

## Neue für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigM-Gen verstärkt wird.

### Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium*

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan  
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigM-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
30 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors M aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
10 genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

20 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

25 coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das sigM-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor M kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigM-Gens aufweisen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
- 15 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor M kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
- 20 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 25 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
- 30 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem

Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene  
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors M und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und  
10 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt  
15 aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die  
20 insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigM-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder  
25 mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und  
30 gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke,

Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- 15 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

- 20 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-Faktor M kodierende sigM-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- Zur Isolierung des sigM-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
- 25 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
  - 30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et

al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 5 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* 10 ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 15 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc $r$ , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) 20 beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy 25 of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von 30 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen sigM kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No.

1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die  
5 sich ergebende Aminosäuresequenz des sigM-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind  
10 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als  
15 „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar  
20 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology  
25 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1  
30 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
35 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
5 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit  
10 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die  
15 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x  
20 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter  
25 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine  
30 Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden,  
35 die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der

eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigM-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns  
5 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology  
10 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24  
(1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides  
15 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigM-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in  
20 coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den  
25 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder PNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise  
30 verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es  
beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and  
35 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur

Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum*

5 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA),

10 PCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder

15 pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))

20 beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

25 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem *sigM*-Gen eines oder mehrere

30 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigM-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 15 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 20 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 25 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-

Dehydratase kodierende Allel *ilvA*(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),

- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- 5 • das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- 10 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sigM*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- 20 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigM*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:
- 25 "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder  
5 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik  
10 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen  
15 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie  
20 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische  
25 Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff  
30 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie

5 z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die

10 genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

15 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem

20 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise

25 bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

30 Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie

35 kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

- 5 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- 10 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

- 15 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

### Beispiel 1

- 20 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

- Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
- 30 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma

Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
5 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
10 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit  
15 Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing  
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.  
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen  
20 in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der  
Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der  
Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular  
Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)  
beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar  
25 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin  
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C  
wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

### Isolierung und Sequenzierung des sigM-Gens

30 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem  
Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

- Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- 10 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 15 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit
- 20 T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.
- 25 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems
- 30 (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
- 35

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"

- 5 Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die

- 10 Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1

- 15 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 675 Basenpaaren, welches als sigM-Gen bezeichnet wurde. Das sigM-Gen kodiert für ein Protein von 224 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; jjjjjj BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1211

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (236)..(907)

&lt;223&gt; sigM-Gen

25

&lt;400&gt; 1

gacaccaatc cacagatgca gatcgctgaa gtacaacttg ttggttggtta aattacgcgt 60

30

ttgtgattga cccccattaa ggtgcgcccgc ccctcagttt cactaactga aggcggggcgt 120

ttttaattta tatatagctt cagctcacag gtatatttcca gaaagaagag ccctcaaagt 180

atgtagcacc tcagcgacac ctcccacttg agtgggcgcc gagaagtatc tctca atg 238

35

Met  
1

gaa aat ctg ccc ata cta agc cgc ata agg gat acg ggg tgt gtc cct 286

Glu Asn Leu Pro Ile Leu Ser Arg Ile Arg Asp Thr Gly Cys Val Pro  
5 10 15

40

caa cct gcg ggg gat ctt atg aca gta ctg cct aaa aac cat gac cta 334

Gln Pro Ala Gly Asp Leu Met Thr Val Leu Pro Lys Asn His Asp Leu  
20 25 30

45

agc gat acc caa ctc gtc aaa cag ttt ata tct ggc gac tcc agg gca 382

Ser Asp Thr Gln Leu Val Lys Gln Phe Ile Ser Gly Asp Ser Arg Ala  
35 40 45

50

ttt tcc acc atc att cac cgc cac gaa cga cat atg atg cag gca gcc 430

Phe Ser Thr Ile Ile His Arg His Glu Arg His Met Met Gln Ala Ala  
50 55 60 65

55

aga aaa tac ggg cgg aaa cca gaa gac gcc caa gac att ctc caa gaa 478

Arg Lys Tyr Gly Arg Lys Pro Glu Asp Ala Gln Asp Ile Leu Gln Glu  
70 75 80

gct ctc ttt cgc gcc agc cga aac atg cac ctt tat aga gca gaa gca 526

Ala Leu Phe Arg Ala Ser Arg Asn Met His Leu Tyr Arg Ala Glu Ala  
85 90 95

5 gct ctc ggc acg tgg ctc cac aaa ctt gtc ctg aat agc ggc ttc gat 574  
 Ala Leu Gly Thr Trp Leu His Lys Leu Val Leu Asn Ser Gly Phe Asp  
 100 105 110  
 tgg gct acc cac cgc tcc caa gta gaa ttc ccc atc ctt aac gaa cca 622  
 Trp Ala Thr His Arg Ser Gln Val Glu Phe Pro Ile Leu Asn Glu Pro  
 115 120 125  
 10 aca atc gat tta gaa aaa gat cct cgc cta gcc acc gac ccc ttg ggc 670  
 Thr Ile Asp Leu Glu Lys Asp Pro Arg Leu Ala Thr Asp Pro Leu Gly  
 130 135 140 145  
 15 tac ctc gat gtc gcc atg aca att cga tcc gcc atc gac caa tta cac 718  
 Tyr Leu Asp Val Ala Met Thr Ile Arg Ser Ala Ile Asp Gln Leu His  
 150 155 160  
 20 ccc gat caa cgc atc gcc tta ata ctt gtc gac ctc ggc ggc tac acc 766  
 Pro Asp Gln Arg Ile Ala Leu Ile Leu Val Asp Leu Gly Gly Tyr Thr  
 165 170 175  
 gta gaa gat gtg gcc gaa atc gaa gga atc aaa gta ggt acc gtt aaa 814  
 Val Glu Asp Val Ala Glu Ile Glu Gly Ile Lys Val Gly Thr Val Lys  
 180 185 190  
 25 tca cgc cga ggg cgc gca cgc aaa gcg ttg cgc gcc ctt tta cat gca 862  
 Ser Arg Arg Gly Arg Ala Arg Lys Ala Leu Arg Ala Leu Leu His Ala  
 195 200 205  
 30 gat ttc ttc ggg ccc gaa gat ggc tcc ata cag tgc gaa agc aac 907  
 Asp Phe Phe Gly Pro Glu Asp Gly Ser Ile Gln Cys Glu Ser Asn  
 210 215 220  
 35 tgatggaagt ttttcaaagt gtctgacgtt gaaaacggtg agttcacaac taggggtgaat 967  
 ggtgcacgtg atgctgcact tttacgttta ctactttgag ggaaacaatg tctgaagaac 1027  
 aatctgccgt agcaccaaag attcatgatg tcgccatcat cggctccggt ccagctggct 1087  
 40 ataccgcagc agtatatgca gcccgcgctg acctcaaccc catcatgttc gagggctatg 1147  
 aatacggtgg atctttgatg accactactg acgtggaaaa cttcccaggc tttgaaaagg 1207  
 45 gaat 1211  
 <210> 2  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 50 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <400> 2  
 Met Glu Asn Leu Pro Ile Leu Ser Arg Ile Arg Asp Thr Gly Cys Val  
 1 5 10 15  
 55 Pro Gln Pro Ala Gly Asp Leu Met Thr Val Leu Pro Lys Asn His Asp  
 20 25 30  
 Leu Ser Asp Thr Gln Leu Val Lys Gln Phe Ile Ser Gly Asp Ser Arg

	35	40	45
5	Ala Phe Ser Thr Ile Ile His Arg His Glu Arg His Met Met Gln Ala 50 55 60		
	Ala Arg Lys Tyr Gly Arg Lys Pro Glu Asp Ala Gln Asp Ile Leu Gln 65 70 75 80		
10	Glu Ala Leu Phe Arg Ala Ser Arg Asn Met His Leu Tyr Arg Ala Glu 85 90 95		
	Ala Ala Leu Gly Thr Trp Leu His Lys Leu Val Leu Asn Ser Gly Phe 100 105 110		
15	Asp Trp Ala Thr His Arg Ser Gln Val Glu Phe Pro Ile Leu Asn Glu 115 120 125		
	Pro Thr Ile Asp Leu Glu Lys Asp Pro Arg Leu Ala Thr Asp Pro Leu 130 135 140		
20	Gly Tyr Leu Asp Val Ala Met Thr Ile Arg Ser Ala Ile Asp Gln Leu 145 150 155 160		
	His Pro Asp Gln Arg Ile Ala Leu Ile Leu Val Asp Leu Gly Gly Tyr 165 170 175		
25	Thr Val Glu Asp Val Ala Glu Ile Glu Gly Ile Lys Val Gly Thr Val 180 185 190		
	Lys Ser Arg Arg Gly Arg Ala Arg Lys Ala Leu Arg Ala Leu Leu His 195 200 205		
30	Ala Asp Phe Phe Gly Pro Glu Asp Gly Ser Ile Gln Cys Glu Ser Asn 210 215 220		
35			

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das sigM-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-  
20 Faktors M aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von  
10 Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend  
höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigM-Gen verstärkt,  
insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere Lysin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
20 daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das sigM-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
25 überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium  
oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
5        d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10    12. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
      d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15    13. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
      d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das sigM-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20    14. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
      d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigM kodiert.
- 25    15. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
      d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 30        15.1        das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
                      kodierende Gen dapA,

- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende  
Gen tpi,
- 5 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende  
Gen pgk,
- 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase  
kodierende Gen zwf,
- 10 15.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen  
pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase  
kodierende Gen mqo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente  
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende  
Gen hom,
- 20 15.11 das für die Theonin-Dehydratase kodierende Gen  
ilvA oder das für eine feed back resistente  
Threonin-Dehydratase kodierende Allel  
ilvA(Fbr),
- 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase  
kodierende Gen ilvBN,
- 25 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase  
kodierende Gen ilvD,
- 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme  
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
5 eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
kodierende Gen pck,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase  
kodierende Gen pgi,
- 10 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2  
abschwächt.
17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der  
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 15 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium  
einsetzt.
- 20 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um  
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene  
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor M kodieren oder  
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sigM-Gens  
aufweisen,
- 25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man das Polynukleotid, enthaltend die  
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3  
oder 4 als Hybridisierungs sonden einsetzt.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigM-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.